

(48)

# Rola chemokin CCL3/ MIP-1 alfa i CCL4/ MIP-1 beta w patogenezie zespołu suchego oka

## *The role of chemokines CCL3/ MIP-1 alfa and CCL4/ MIP-1 beta in pathogenesis of dry eye syndrom*

Roman Malesiński<sup>1</sup>, Alina Bakunowicz-Łazarczyk<sup>2</sup>, Jolanta Wysocka<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Z Oddziału Chorób Oczu Wojewódzkiego Szpitala Zespołowego w Białymstoku  
Ordynator: dr n. med. Bogusław Żywalewski

<sup>2</sup> Z Kliniki Okulistyki Dziecięcej Dziecięcego Szpitala Klinicznego w Białymstoku  
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Alina Bakunowicz-Łazarczyk

<sup>3</sup> Z Zakładu Diagnostyki Laboratoryjnej Pediatricznej Dziecięcego Szpitala Klinicznego w Białymstoku  
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Jolanta Wysocka

### Summary:

**Purpose:** To evaluate the concentration of chemokines CCL3/ MIP-1 alfa and CCL4/ MIP-1 beta in film tears in patients with dry eye syndrom.

**Material and methods:** Tears samples were collected from 62 patients with dry eye syndrom and 18 patients from control group. The concentration of chemokines in film tears were determined by immunoenzymatic assay ELISA.

**Results:** We found statistically increased levels of chemokines CCL3/ MIP-1 alfa and CCL4/ MIP-1 beta in film tears of patients with dry eye syndrom compared with control group.

**Conclusion:** Inflammation may play role in pathogenesis of dry eye syndrom.

### Słowa kluczowe:

chemokiny, zespół suchego oka, białko zapalne makrofagów.

### Key words:

chemokines, dry eye syndrom, macrophage inflammatory protein.

### Wstęp

W ostatnich latach coraz więcej uwagi przywiązuje się do roli procesów immunologicznych w patogenezie wielu schorzeń gałki ocznej i ich rozwoju, w tym zespołu suchego oka (1,2,3). Wśród przyczyn zespołu suchego oka coraz częściej jest wysuwane tło immunologiczne i zapalne. Jednocześnie liczba badań i publikacji odnoszących się do tego zagadnienia jest stosunkowo niewielka. Wydaje się więc uzasadnione podjęcie badań nad profilem immunologicznym łez uzyskanych od chorych z zespołem suchego oka.

### Material i metodyka

Material do badań stanowił płyn łzowy pobrany od pacjentów z rozpoznaniem zespołem suchego oka ze zmniejszoną objętością wydzielanych łez, niechorujących na zespół Sjögrena według podziału National Eye Institut z 1995 roku i od osób zdrowych zakwalifikowanych do grupy kontrolnej. Badania objęto 62 próbki płynu łzowego pobrane od 62 pacjentów z zespołem suchego oka, w tym 48 od kobiet (77,4%) i 14 od mężczyzn (22,6%) w wieku od 31 lat do 82 lat (średnio 64,87 roku  $\pm$  10,56 roku), oraz od 18 pacjentów z grupy kontrolnej osób zdrowych, niestosujących leków okulistycznych i nieużywających soczewek kontaktowych. Wszystkich pacjentów z zespołem suchego oka poddano dokładnemu badaniu okulistycznemu. Płyn łzowy był uzyskiwany za pomocą szklanych mikrokapilar, które umiejscowiono w kącie zewnętrznym oka. W trakcie pobierania nie dotykano spojówki i rogówki. Nie stosowano stymulacji śluzówki nosa. Przed pobraniem łez

nie znieczulano powierzchni oka, pacjenci nie stosowali żadnych leków miejscowych, nie wykonywano żadnych testów diagnostycznych oka. Łzy z obojga oczu pobierano w ciągu 10-15 minut. Po zmieszaniu zamrażano w temperaturze -70 stopni C. Analizę płynu łzowego wykonywano metodą immunoenzymatyczną ELISA, stosując odpowiedni zastaw diagnostyczny PIERCE ENDOGEN. Wykorzystywano płytkę (96 dołków) opłaszczoną monoklonalnymi przeciwciałami specyficznych chemokin, do której odpipetowano odpowiednią objętość wcześniej przygotowanych standardów i próbek płynów łzowych danych pacjentów. Płytkę inkubowano 2 godziny. Następnie całość płukano roztworem płuczającym i ponownie inkubowano wraz z roztworem koniugatu (Strep-tavidin). Po ponownym płukaniu do dołków dodano enzym (TMB), inkubowano i odczytywano wynik z krzywej kalibracyjnej. Intensywność zabarwienia zmierzono fotometrycznie w czytniku ELISA (ANTOS) przy długości fali 450 nm. Wszystkie procedury dotyczące czasu inkubacji, rozcieńczeń standardów i częstości płukania płytki zostały wykonane zgodnie z instrukcją dołączoną do zestawu.

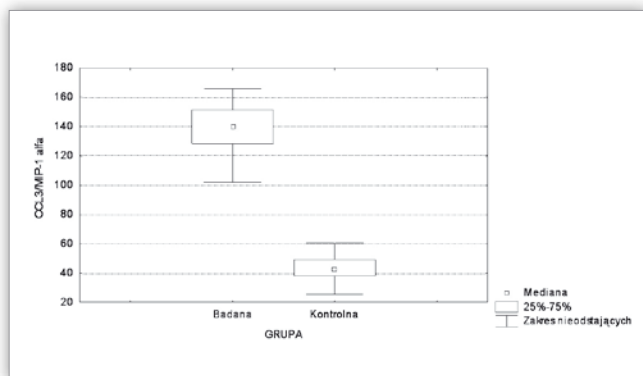
### Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej, w której wyliczono średnią arytmetyczną, odchylenie standardowe, wartości minimalne i maksymalne oraz medianę. Do analizy statystycznej między grupami użyto testu Manna-Whitney'a. W obliczeniach przyjęto poziom istotności  $p < 0,05$  jako znamienne statystycznie.

### Wyniki

Średnie stężenie CCL3/MIP-1 alfa w płynie łzowym pacjentów z zespołem suchego oka wynosiło  $140,20 \pm 18,34$  pg/ ml, podczas gdy stężenie CCL3/MIP-1 alfa we łzach pacjentów z grupy kontrolnej wynosiło  $40,88 \pm 11,12$  pg/ ml. Stężenie CCL3/MIP-1 alfa w płynie łzowym pacjentów z zespołem suchego oka jest znamienne statystycznie wyższe niż we łzach pacjentów z grupy kontrolnej,  $p = 0,001$ .

Stężenie chemokiny CCL3/MIP-1 alfa we łzach pacjentów z zespołem suchego oka i osób z grupy kontrolnej przedstawia rycina 1.

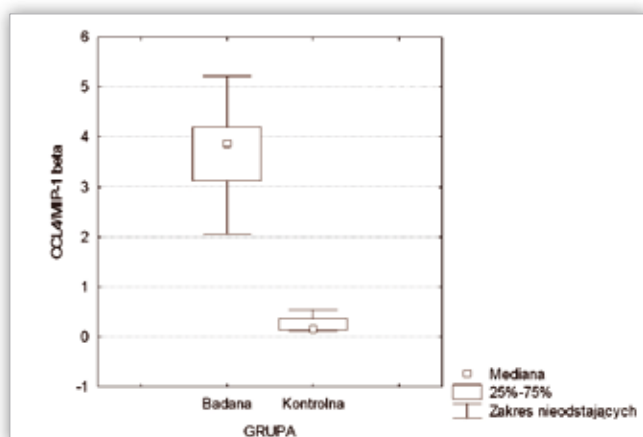


Ryc. 1. Średnia wartość stężenia CCL3/MIP-1 alfa w płynie łzowym pacjentów z zespołem suchego oka i osób z grupy kontrolnej.

Fig. 1. Mean value concentration of CCL3/MIP-1 alfa in film tears in patients with dry eye syndrome and in control group.

Średnie stężenie CCL4/MIP-1 beta w płynie łzowym pacjentów z zespołem suchego oka wynosiło  $3,74 \pm 0,82$  pg/ ml, podczas gdy stężenie CCL4/MIP-1 beta we łzach pacjentów z grupy kontrolnej wynosiło  $0,26 \pm 0,19$  pg/ ml. Stężenie CCL4/MIP-1 beta we łzach pacjentów z zespołem suchego oka jest statystycznie znamienne wyższe niż u osób w grupie kontrolnej,  $p = 0,001$ .

Stężenie chemokiny CCL4/MIP-1 beta we łzach pacjentów z zespołem suchego oka i osób z grupy kontrolnej przedstawia rycina 2.



Ryc. 2. Średnie stężenie CCL4/MIP-1 beta w płynie łzowym pacjentów z zespołem suchego oka i osób z grupy kontrolnej.

Fig. 2. Mean concentration of CCL4/MIP-1 beta in film tears in patients with dry eye syndrome and in control group.

### Dyskusja

Białko zapalne makrofagów (Macrophage inflammatory protein) MIP-1 alfa zostało zidentyfikowane w 1988 roku jako pierwsze z rodziny MIP-1 CC, do której obecnie zaliczamy CCL3/ MIP-1 alfa, CCL4/MIP-1 beta, CCL9/10 /MIP-1 sigma i CCL15/ MIP-1 gamma. Chemokiny te wytwarzane są przez wiele różnych komórek, głównie przez makrofagi, komórki dendrytyczne, limfocyty T i B, neutrofile, komórki tłuszczne i komórki NK (4). W znacznie mniejszych ilościach mogą być produkowane po stymulacji przez płytki krwi, osteoblasty, astrocyty, komórki epitelialne i fibroblasty. Generalnie synteza i uwalnianie CCL3/MIP-1-alfa i CCL4/MIP-1-beta wymagają aktywacji komórki, chociaż pewien podstawowy poziom ekspresji jest oznaczalny w komórkach bez stymulacji, szczególnie w neutrofilach. Produkcja chemokin MIP-1 może być indukowana przez różne czynniki prozapalne, np.: infekcje wirusowe, substancję P oraz prozapalne cytokiny, takie jak: TNF alfa, INF gamma, IL-1 alfa, IL-1 beta. Z kolei czynniki przeciwzapalne, takie jak IL-4, IL-10, zmniejszają ekspresję chemokin MIP-1. Obszerna literatura dokumentuje obecność chemokin i receptorów chemokin w płynach biologicznych, biopłatach i tkankach pobranych od pacjentów w trakcie operacji chirurgicznych, u których występował stan zapalny (2,4,5). Wykazano, że ligandy dla receptorów CXCR1 i CXCR2 częściej stwierdza się w ostrych stanach zapalnych, podczas gdy CCR1, CCR2, CCR5 i CXCR3 są wszechobecne w przewlekłych stanach zapalnych (2,6). Zespół suchego oka to choroba przewlekła, często trwająca wiele lat, z okresami zaostrzeń. Chemokiny CCL3/ MIP-1 alfa i CCL4/ MIP-1 beta poprzez receptory CCR1, CCR3 i CCR5 aktywują limfocyty, monocyty i makrofagi, osiągając efekt chemotaktyczny i prozapalny. Uczestniczą w wielu ostrych i przewlekłych reakcjach zapalnych, rekrutując komórki prozapalne. CCL3/MIP-1 alfa poprzez receptor CCR1 aktywuje monocyty, limfocyty T, neutrofile i eozynofile, poprzez receptor CCR5 – monocyty, limfocyty T i komórki dendrytyczne. CCL4/ MIP-1 beta poprzez receptor CCR5 najsilniej rekrutuje monocyty, limfocyty T i komórki dendrytyczne. W zespole suchego oka dochodzi do zaburzenia jednostki funkcjonalnej, jaką stanowi film łzowy, nabłonek rogówki i spojówki oraz gruczoły łzowe i gruczoły Meiboma. Niezależnie od pierwotnej przyczyny dochodzi do stanu zapalnego powierzchni oka, obniżenia produkcji łez, wystąpienia objawów zadrażnienia i uszkodzenia powierzchni oka. Istotną rolę w rozwoju modulacji przebiegu zapalenia odgrywają mediatory reakcji zapalnych, którymi są chemokiny. W dostępnej literaturze brak jest doniesień dokumentujących udział chemokin MIP-1 w zespole suchego oka. Podkreśla się ich kluczową rolę w patogenezie astmy, zapalenia stawów, stwardnienia rozsianego, zapalenia płuc, łuszczycy oraz tworzeniu ziarniny i gojeniu się ran (5). CCL3/ MIP-1 alfa i CCL4/ MIP-1 beta uwolnione z neutrofilii obecnych w miejscu uszkodzenia skóry powodowały napływ makrofagów w modelu tworzenia ziarniny (7). CCL3/ MIP-1 alfa bierze udział także w chemotaksji makrofagów do miejsca tworzenia blizny skórnej (8). W modelu astmy CCL3/ MIP-1 alfa powoduje chemotaksję eozynofili, uwolnienie histaminy i rozwój eozynofilii (9). CCL3/ MIP-1 alfa i CCL4/ MIP-1 beta indukują odpowiedź zapalną przeciwko patogenom takim jak wirusy i pasożyty (10,11). W zakażeniu *Toxoplasma gondii* chemokiny CCL3/MIP-1 alfa i CCL4/ MIP-1 beta stymulują syntezę IL-12 uwalnianą z komórek dendrytycznych (5). Stwierdzo-

no podwyższony poziom CCL3/ MIP-1 alfa i CCL4/ MIP-1 beta w surowicy pacjentów z układowym toczniem trzewnym (12). Badana jest także rola innych chemokin w różnych chorobach gałki ocznej (1,3,13,14).

### Wniosek

Obecność chemokin CCL3/MIP-1 alfa i CCL4/MIP-1 beta w płynie łzowym pacjentów z zespołem suchego oka przema-  
wia za udziałem procesu zapalnego w tym schorzeniu.

### Pismienictwo:

1. Crane IJ, Wallace CA, Mc Killop-Smith S, Knott RM, Forrester JV: *Cytokine regulation of RANTES production by human retinal pigment epithelial cells*. Cell Immunol 1998, 184, 37-44.
2. Gerard C, Rollins BJ: *Chemokines and disease*. Nature Immunol 2001, 2, 108-115.
3. Wallace GR, Curnow SJ, Wloka K, Salmon M, Murray PI: *The role of chemokines and their receptors in ocular disease*. Retinal and Eye Research 2004, 23, 435-448.
4. Maurer M, von Stebut E: *Macrophage inflammatory protein – 1*. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology 2004, 36, 1882-1886.
5. Murdoch C, Finn A: *Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases*. Blood 2000, 95, 3032-3043.
6. Waśniowska K: *Chemokiny – perspektywy zastosowania związków blokujących ich działanie w terapii*. Post Hig Med Dosw 2004, 58, 37-46.
7. Stebut E, Metz M, Milon G, Knop J, Maurer M: *Early macrophage influx to sites of cutaneous granuloma formation is dependent on MIP 1 alfa/ beta released from neutrophils recruited by mast cell derived TNF alfa*. Blood 2003, 101, 210-215.
8. Di Pietro LA, Burdick M, Low Q, Kunkel SL, Strieter RM: *MIP-1 alfa as a critical macrophage chemoattractant in murine wound repair*. Journal of Clinical Investigation 1998, 101, 1693-1698.
9. Venge J, Lampinen M, Hakansson L, Rak S, Venge P: *Identification of IL-5 and RANTES as the major eosinophil chemoattractants in the asthmatic lung*. Journal of Allergy and Clinical Immunology 1996, 97, 1110-1115.
10. Menten P, Wuyts A, von Damme J: *Macrophage inflammatory protein –1*. Cytokine Growth Factor Reviews 2002, 13, 455-481.
11. Aliberti J, Reis E, Sousa C, Schito M, Hieny S, Wells T, Huffnagle GB, Shern A: *CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD 8 alpha+ dendritic cells*. Natural Immunology 2000, 1, 83-87.
12. Vila LM, Molina MJ, Mayor AM, Cruz JJ, Rios-Olivares E, Rios Z: *Association of serum MIP-1 alpha, MIP-1 beta, and RANTES with clinical manifestations, disease activity, and damage accrual in systemic lupus erythematosus*. Clin Rheumatol 2006, 19, 369-375.
13. Holtkamp GM, De Vos AF, Peek R, Kijlstra A: *Analysis of a secretion pattern of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and transforming growth factor- beta 2 (TGF beta 2) by human retinal pigment epithelial cells*. Clin Exp Immunol 1999, 118, 35-40.
14. Kurtz RM, Elnor VM, Bian ZM, Streiter RM, Kunkel SL, Elnor SG: *Dexamethasone and cyclosporin A modulation of human retinal pigment epithelial cell monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8*. Invest Ophthalmol Vis Sci 1997, 38, 436-445.

Praca wpłynęła do Redakcji 20.02.2008 r. (1026)  
Zakwalifikowano do druku 11.03.2008 r.

**Adres do korespondencji (Reprint requests to):**  
lek. med. Roman Malesiński  
ul. Pułaskiego 150  
15-338 Białystok

# Polskie Towarzystwo Okulistyczne

e-mail: [pto@pto.com.pl](mailto:pto@pto.com.pl)